植物及環境細菌之鑑定與保存

古家榮[1] 蔡佳欣[2,*]

[1] 財團法人食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心。台灣 新竹市。
[2] 行政農業委員會農委會農業試驗所植物病組。台灣 台中市。

摘要

微生物鑑定的技術日新月益，從表現型(phenotype)、化學型(chemical type)和基因型(genotype)，統稱的多相分類學(polyphasic taxonomy)，近年更加入培養體學(culturomics)、蛋白質體學(proteomics)及基因體學(genomics)三者必備的年代。分類學家不斷的精進鑑定技術，期望能解決微小生物世界複雜的分類問題。幾乎每個研究人員都希望能夠快速、高通量的得到分析結果，以便於處理邊境檢疫、國內防疫的迫切需求。

關鍵詞：細菌鑑定、保存、16S rRNA 基因序列、MALDI-TOF MS、全基因體定序

前言

只要是生物，就常常將它們歸類成有益及有害，通常這都是以人類的角度作歸群。此會議討論的主題為作物有害生物分類鑑定，探討植物病蟲害的根源進而對檢、防疫進行有效管理。筆者所處的工作環境，較常接觸非病原性細菌，在此就以有益生物(細菌)為例，介紹現今細菌方面的鑑定與保存。益生菌(probiotics)，泛指有益生命的菌皆可稱之。地球上有生命的物體涵括動物及植物，但這個名詞在動物尤其是人類生活及食材搭配已廣為被接受，使用的歷史也近一個世紀之久，一般講益生菌常常就是專指對人或動物直接作關聯性。以植物的角度來看，查詢農委會網站，微生物肥料的定義可算是益生菌的一環，對植物及環境都是有善的一種材料。網站列出「鑑定為安全微生物肥料菌種」，8 種細菌、真菌及酵母菌各 4 種。依比例來看，細菌類佔 50%。另查詢農糧署網站，列出國產微生物肥料推薦的品牌(111 年 6 月 15 日

*論文聯繫人
E-mail: tsaich@tari.gov.tw

更新)，除了一株酵母菌(*Candida guilliermondii*)外，清一色使用的菌種皆為芽孢桿菌屬內的菌(*Bacillus* sp.)。於人類食材利用方面，查詢食藥署「可供食品使用原料彙整一覽表」，111 年 6 月 21 日修正為「食品原料整合查詢平臺」，被列為可使用的原料菌種(111 種)。細菌類佔 66.7%，其中很大部份為乳酸菌，少部份的醋酸菌、納豆菌等。列表中的學名，很多還是沿用舊名(俗名)，例如植物乳酸桿菌(*Lactobacillus plantarum*)依新的研究證據，已更動至新的屬(*Lactiplantibacillus*)。建議可將學名進行新舊名並列，讓大眾一目了然。以食品所的觀點搭配植物防檢疫的角度往後看，我們所用的食材從農場到餐桌過程中，其衛生安全及風險控管最關鍵的焦點在於產地、原料是否受到污染，這也是防疫最重要的起點。農場算是一切的源頭，撇除非生物性因子對植物造成的災害(風災、水害、乾旱、寒害、肥傷及藥害等)，另一個系統性、無法以肉眼辨識的生物性因子就是微生物。植物受病菌感染，有些會產生病徵，此時就有賴於植病研究者及微生物分類學家進行鑑定，了解病原菌後才能對症治療或預防。

細菌分類鑑定方法

最早的微生物鑑定者，起源於發明顯微鏡的雷文霍克。他開啟微小世界五花八門多采多姿的年代。隨時間的進展，越來越多研究人員加入微小世界的探索、辨識行列;單靠形態、文字描述，漸漸地無法區分物種間的歧異度。物種多樣性及研發技術的精進，試著將細菌關在有氧、缺氧的環境、不同酸鹼值、不同碳水化合物的利用、產生酵素的種類、是否會產氣與否...等種種特徵，加以分門別類，為的就是要將細菌(微小生物)加以鑑定。以上的特徵，也就是表現型(pheotype)的試驗及觀察，首先提出快速偵測表現型反應的當推 BioMérieux 公司的 API 鑑定系統。這系統將複雜的生化試驗整合至套裝試驗組，例如 API 50 CHB，API 50 CHL、API 20 NE...等，因為入門的成本低，廣為學、研、業界在細菌入門鑑定所採納。因為人們對時效的要求，此系統演進出另一套自動化機型，也就是 Vitek 2 compact 系統，只要將欲檢測之菌液，依照資料庫內建議的濃度進行調配，例如 0.5 McFarland 或 2 McFarland，再搭配 BioMérieux 公司的卡片，置於機器整合之恆溫箱，即可自行吸取至卡片內。快的話，人體腸內菌在 3–6 小時即可分析出結果。但缺點就是資料庫的菌株數量少，主要只針對細菌和少部份酵母菌，合計將近 700 個種。另一套系統為半自動化系統，BiOLOG。使用前也需利用濁度計調配指引建議的濃度再將菌液灌注到 96 孔盤中，置於合適的生長溫度及時間，試驗盤再利用分光光度計及系統內的資料庫比對分析。

於 BiOLOG 網站中列出此系統可快速、精確地鑑定超過 2900 個好氧、厭氧細菌、酵母菌及真菌物種。

隨著培養條件的不同，某些細菌容易受到影響而使得表現於外的特徵往往會有所差異，這也造就了菌株層次的討論。不同的研究學派對於細菌的種數有著不同的觀點，多虧有總體基因體學(metagenomics)的論點，讓我們了解目前可培養的細菌只有 1%，還有 99%的細菌是無法培養馴化的。利用此技術可以直接從環境中取得所需的序列片段(Handelsman 2004)，不需經過分離培養。2005 年次世代定序儀的問世，2008 年也開啟了人體微生物組計畫(human microbiome project)，導引出各行各業微生物組(microbiome)及各種體學的蓬勃發展。之所以被稱為次世代定序，是不同於第二代的 Sanger 化學法之故(Besser *et al.* 2018)。隨著技術不斷的精進，快速與高通量已成為現今儀器開發商需具備的最低門檻。檢測的時程往往都被要求要能夠縮短至少一半以上。

各個菌種在分類鑑定時期，都有研究人員整理列出最低要求; 以產胞好氧細菌為例(Logan *et al.* 2009)，在對菌種進行發表描述時，必需做的項目為何？舉例來說，像是顯微構造、巨觀形態、生理生化試驗、化學特徵(脂肪酸組成、細胞壁成份分析)、核酸研究(16S rRNA 基因序列需大於 1400 核苷酸; 需有親緣演化分析，這個基因片段已是原核生物鑑定時的第一步準則)與相近菌種的 DNA-DNA 相似性分析等。同時會列出建議要分析的項目，例如鞭毛型式、利用葡萄糖後的產氣狀態、持家基因的親緣演化分析。通常這些建議都屬於必需要完成，才能確定出一個物種。以乳酸菌為例，Mattarelli 等(2014)也提出在描述菌種特徵時分為必要的和額外的項目，從字面上解讀這額外的項目，在著作受到同儕審查時，可以討論並取捨是否要進行試驗。從以上來看，細菌鑑定必備的三大特徵，表現型(phenotype)、化學型(chemical type)和基因型(genotype)，三者統合稱為多相分類學(polyphasic taxonomy)。一直以來，DNA 雜合技術(DNA-DNA hybridization)是微生物分類鑑定的黃金標準，相近物種間的相似性大於 70%，即被認定為同一物種，小於則為亞種或不同種。但此項實驗於各實驗室的操作再現性不佳、耗時與數據資料無法累積，資訊不發達的時代，易造成菌種學名錯誤及分類地位更動的情況經常出現(Wittouck *et al.* 2019)。

隨著 DNA 定序技術的發展及成本降低外，全基因體定序分析(whole genome sequencing, WGS)已被導入細菌多相分類的一環。有了全基因體定序的資料，可以取代 DNA hybridization、DNA GC content 及多基因座序列分析(multilocus

sequence analysis; MLSA)等資料無法累積、共享及再現性不佳的缺點。Chun 等人(2018)提出以基因體序列分析作為原核生物分類鑑定的最基本標準後，細菌分類學家提出的物種依據都必需有此項分析，以此為基礎進行物種間 OGRI (overall genome relatedness index)相似性測定。這指數包含例如 ANI(average nucleotide identity)、及 dDDH (digital DNA-DNA hybridization)等分析。兩個數值的判斷標準分別為 95–96%及 70%，只要大於這個數值即被認定為同一物種。也因如此，以往常食用的乳酸菌保健食品，最常見的菌種屬名為 *Lactobacillus* sp.，內含 261 個種，如今已被拆分至 25 個屬之多。

另一個目前新興且熱門的鑑定分析技術為培養體學結合蛋白質體學，說新興也超過十年了。這是基於人體微生物組計畫後，腸道微生物吸引研究人員的興趣。如何能把深植腸道的微生物於體外成功培養，並快速分析出來。雖然 metagenomics 可以得到基因序列的資訊，但菌養不出來仍舊無法利用。快速且高通量的蛋白質體學分析方法，首推 MALDI-TOF MS。此方法為解析微生物全細胞蛋白質，分析分子量為 2000–20000 Daltons 範圍的蛋白質。這部份的蛋白質為核醣體蛋白(ribosomal proteins) 及結構性蛋白 (structural proteins) 系列的持家蛋白質 (housekeeping protein) 所組成 (Dieckmann *et al.* 2008)，較不易受到培養條件的改變而影響。因為菌必需長的出來才能進行蛋白質體學分析，這兩種體學是經常搭配使用。也因為快速、高通量的關係，可以將培養出的菌株進行去重複化工作，進而降低研究成本。

菌種保存

現今的菌種要長期保存，方法不外乎兩種，一為冷凍(cryopreservation)，另一為凍乾(lyophilization); 兩者截然不同，或可稱前者為濕式，後者為乾式，其他短期的暫存法在此不提。兩種方法各有優缺點，以更長遠的角度來看，能使用乾式保存就盡量會選用此，只要菌種承受的住昇華造成的傷害，保存 20 年後仍可順利培養。

總結

細菌鑑定最初步、最快速的分類歸群還是要以獲得 16S rRNA 基因序列為主，公領域的 NCBI GenBank、EzBioCloud(Yoon *et al.* 2017)序列資料庫是免費而且再現性佳，用來進行分析比對較為正確且客觀。資料越來越多，常常一株菌可能被登錄 2–3 條序列，使用者在比對時要確認再確認其正確性。序列資料庫的維穩，背後是需要很多人及成本的維護。隨著物種發表的量越來越多，此項特徵在某些相近菌群的解析度已無法區分彼此，必需佐以持家基因序列進行分析。若

經費充裕可採取更全面性的全基因體序列資料，讓難題迎刃而解。有了 16S rRNA 基因序列並將之建構於快速高通量的 MALDI-TOF MS 資料庫內，逐步包含各種菌類，與世界上其他微生物資源中心能夠進行資料庫交換。細菌鑑定的最終目的，希望能取得物種正確的名字，關於名字是否合法使用，原核生物類必需參考國際期刊 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) 內是否有被發表或認可。在它種期刊發表的物種出刊後，必需同步送至 IJSEM 進行審核，才被視為有效。要能夠長久使用好用的菌種，端賴穩定的保存系統讓菌永續下去。實驗室在行有餘力的狀況下，可選用濕式或乾式的方法;再者，也可外包給有信譽的保存中心，例如食品所生資中心，會是研究人員的首選。

參考文獻

Besser, J., H. A. Carleton, P. Gerner-Smidt, R. L. Lindsey, and E. Trees. 2018. Next-generation sequencing technologies and their application to the study and control of bacterial infections. Clin. Microbiol. Infect. 24: 335–341.

BiOLOG。Microbial Identification。網址 (https://www.biolog.com/products-portfolio-overview/microbial-identification/)。瀏覽日期 2022 年 6 月 25 日。

BioMérieux。VITEK® 2 COMPACT Compact, automated ID/AST instrument。網址 (https://www.biomerieux-diagnostics.Com/vitekr-2-compact-0)。瀏覽日期 2022 年 6 月 25 日。

Chun, J., A. Oren, A.Ventosa, H. Christensen, D. R. Arahal, M. S. da Costa, A. P. Rooney, H. Yi, X. W. Xu, S. De Meyer, and M. E. Trujillo. 2018. Proposed minimal standards for the use of genome data for the taxonomy of prokaryotes. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 68: 461–466.

Dieckmann, R., R. Helmuth, M. Erhard, and B. Malorny. 2008. Rapid classification and identification of Salmonellae at the species and subspecies levels by whole-cell matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 74: 7767–7778.

Handelsman, J. 2004. Metagenomics: application of genomics to uncultured microorganisms. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 68: 669–

685.

Logan, N. A., O. Berge, A. H.Bishop, H.-J. Busse, D. De Fritze, M. Heyndrickx, P. Kämpfer, L. Rabinovitch, M. S. Salkinoja-Salonen, L. Seldin, and A. Ventosa. 2009. Proposed minimal standards for describing new taxa of aerobic, endospore-forming bacteria. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 59: 2114–2121.

Mattarelli, P., W. Holzapfel, C. M. A. Franz, A. Endo, G. E. Felis, W. Hammes, B. Pot, L. Dicks, and F. Dellaglio. 2014. Recommended minimal standards for description of new taxa of the genera *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* and related genera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 64: 1434–1451.

Wittouck, S., S. Wuyts, and S. Lebeer. 2019. Towards a genome-based reclassification of the genus *Lactobacillus*. Appl. Environ. Microbiol. 85: e02155–18.

Yoon, S. H., S. M. Ha, S. Kwon, J. Lim, Y. Kim, H. Seo, and J. Chun. 2017. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 67:1613–1617.

Zheng, J., S. Wittouck, , E. Salvetti, , C. M. A. Franz, , H. M. B. Harris, *et al*. 2020. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 70: 2782–2858.

行政院農委會。鑑定為安全微生物肥料菌種。網址(https://www.coa.gov.tw/ws. php ?id=23858)。瀏覽日期 2022年6月24日。

行政院農委會農糧署。國產微生物肥料推薦的品牌。網址(https://www.afa.gov.tw/cht/index.php?code=list&flag=detail&ids=2212&article_id=50154&keyword=%E5%BE%AE%E7%94%9F%E7%89%A9%E8%82%A5%E6%96%99)。瀏覽日期 2022年6月24日。

財團法人食品工業發展研究所生資中心。 網址(https://www.bcrc.firdi.org.tw/c_service/c09_profile/)。瀏覽日期

2022 年 6 月 24 日。

衛生福利部食品藥物管理署。食品原料整合查詢平臺。網址(https://consumer.fda.gov.tw/Food/Material.aspx?nodeID=160)。瀏覽日期 2022 年 6 月 25 日。

Identification and preservation of plant and environmental bacteria

Jia-Rong Ku [1] and Chia-Hsin Tsai [2,*]

[1]Bioresource Collection and Research Center, Food Industry Research and Development Institute, Hsinchu, Taiwan, ROC.

[2]Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute, Taichung city, Taiwan, ROC.

Abstract

The technology of microbial identification is changing rapidly, from phenotype, chemical type and genotype, collectively known as polyphasic taxonomy, to culturomics, proteomics and genomics. Taxonomists are constantly refining identification techniques in the hope of solving the complicated taxonomic problems of the world of tiny organisms. Almost every researcher wants to be able to obtain the results of the analysis quickly and with high throughput, so as to handle the urgent needs of border quarantine and domestic epidemic prevention.

Key words: bacterial identification, preservation, rRNA gene sequence, MALDI-TOF MS, whole-genome sequencing

* Corresponding author.

E-mail: tsaich@tari.gov.tw